



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

Título: El diagnóstico veterinario de laboratorio en un modelo de síndrome de aborto bovino.

Alumno: Med. Vet. Gastón Casasnovas

Director: Dr. Mortola, Eduardo

RESUMEN

El síndrome de aborto bovino es un desafío desde el punto de vista diagnóstico. Su análisis en busca de un agente causal es fundamental, aunque las probabilidades de éxito no son altas. El laboratorio de diagnóstico es una herramienta fundamental que sirve para trabajar en conjunto con los veterinarios de campo y apoyar sus conocimientos en busca de una solución al problema. Las pruebas de laboratorio deben ser interpretadas con criterio y teniendo en cuenta las características clínicas y epidemiológicas del caso, muchas veces se trabaja con pruebas indirectas que detectan una respuesta inmune humoral y cuyos resultados deben interpretarse con criterio clínico para evitar conclusiones erróneas. La sanidad es un punto imprescindible en los sistemas productivos y el trabajo del laboratorio de diagnóstico es primordial por los aportes que realiza, tanto en la prevención como en la resolución de problemas sanitarios.

INTRODUCCIÓN

La importancia de diagnosticar de forma correcta las diferentes patologías para salvaguardar la salud y la productividad de los animales de producción, es la consigna primordial actual en el sistema productivo veterinario. Con el diagnóstico de las enfermedades en forma rápida, precisa y fiable, se conseguirá mejorar la salud, el bienestar y la productividad de los animales.

Realizar un diagnóstico sobre un problema sanitario es sumar varios tipos de información para luego analizarlos, demostrando la relación causal entre el agente etiológico y la enfermedad. Para tal fin, deben aplicarse distintas metodologías diagnósticas, que no son excluyentes sino complementarias. Partimos de la base de tres tipos de diagnósticos: 1. Diagnóstico epidemiológico 2. Diagnóstico anatomopatológico y 3. Diagnóstico de laboratorio (Di Cola, G., 2014).

Para arribar al diagnóstico epidemiológico, siempre es necesario analizar la anamnesis (sobre ambiente, nutrición y manejo), como pilar fundamental de un diagnóstico clínico "presuntivo" y junto a la sintomatología y a las lesiones anatomopatológicas de los individuos afectados, constituye una herramienta indispensable para caracterizar una patología en el marco de un sistema productivo. De esta manera, mediante los datos obtenidos durante la anamnesis, el veterinario sanitarista podrá inferir por ejemplo, la

posible etiología de un brote de abortos, relacionando el tercio de gestación en el cual ocurre con la presentación de "tormentas" o abortos en "goteo". El diagnóstico anatomopatológico es una herramienta útil para caracterizar a través de la observación de lesiones "patogénicas" o compatibles con una patología, la posible causa de muerte de un animal. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el diagnóstico sólo puede darse como "compatible" con distintas enfermedades, sin que pueda definirse con exactitud la verdadera etiología desencadenante. El diagnóstico de laboratorio si bien es el de mayor rigor científico, ya que permite detectar en forma directa o indirecta (mediante análisis serológico) el agente causal, tiene la limitación de que sólo puede ser interpretado en conjunto con los diagnósticos anteriores, ya que la sola presencia de un microorganismo aislado del individuo enfermo, no es confirmatoria de la patología sospechada. El diagnóstico puede ser individual o poblacional (Di Cola, G., 2014).

En el diagnóstico de laboratorio se recurre a los métodos directos y/o indirectos. Los métodos directos son aquellos que detectan la presencia del agente o su ácido nucleico en la muestra clínica (sangre, orina, órganos) y entre ellos se pueden mencionar el aislamiento, la inmunofluorescencia directa, la observación microscópica directa y las técnicas moleculares (Tizard, I., 2009).

Los métodos indirectos son aquellos en los que se revela indirectamente el contacto del individuo con el agente infeccioso y consiste en la detección de anticuerpos específicos y las pruebas de inmunidad celular (Tizard, I., 2009).

La respuesta inmune frente a los agentes infecciosos puede ser natural (como consecuencia de una infección activa) o adquirida (resultante de una vacunación). En el laboratorio es posible medir esta respuesta, mediante diferentes técnicas de diagnóstico, caracterizadas por su sensibilidad y especificidad (Tizard, I., 2009).

Uno de los aspectos limitantes de la eficiencia de los rodeos de bovinos está representado por la incidencia de las enfermedades infecciosas de la reproducción. A pesar de los esfuerzos realizados para prevenir la difusión de las mismas, aún continúan siendo un problema. (Campero, C.M., 2000).

El aborto, definido como la expulsión de un feto no viable entre los 42 y 260 días de gestación, (Thurmond, M.C., & Picanso, J.P., 1990) se produce como consecuencia de una relación materno-fetal alterada por diversos factores: infecciosos y parasitarios, ambientales y genéticos (Campero, C.M., 2006) causando uno de los problemas sanitarios

más importantes a nivel mundial por el impacto económico negativo que produce. (Fernandez, et al., 2007).

Numerosos trabajos han evidenciado que la mayoría de los abortos son causados por agentes infecciosos. (Campero et al., 2003; Fernandez, et al., 2007; De Luca, L.J., 2002). Siendo *N. caninum* y enfermedades bacterianas las causas más comunes diagnosticadas en laboratorios a nivel mundial (Foster, R.A., 2012).

Los agentes infecciosos involucrados en abortos pueden dividirse en bacterianos, virales, parasitarios y fúngicos:

Agentes Bacterianos:

***Brucella abortus*:** La brucelosis es una enfermedad contagiosa del ganado que tiene importantes consecuencias económicas. La causan diversas bacterias de la familia Brucella, en el caso del bovino *Brucella abortus*. Es una enfermedad zoonótica y debe ser notificada de manera obligatoria a la OIE (Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2004). La merma en la producción de leche, la infertilidad y subfertilidad en vacas y toros son características de la enfermedad, pero el aborto y la retención de placenta son los signos más importantes. (Draghi M.G., 2001)

La vía de entrada de la bacteria es a través de las mucosas, la vía oral es la principal, en bovinos no es una enfermedad venérea a pesar de que el toro elimina brucelas por semen (Samartino, L., 2003). Una vez que ingresa la bacteria, se localiza en los nódulos linfáticos. Si sobrevive a esta primera barrera de defensas, provoca una infección local, seguida por una bacteriemia que puede durar de dos a ocho semanas (SENASA, 2006), estos microorganismos son intracelulares facultativos, por lo que pueden eludir los mecanismos de defensa del huésped y presentan afinidad por los órganos reproductivos tanto en machos como en hembras, sobre todo gestantes por la producción de eritritol (Draghi M.G., 2001), este azúcar alcanza niveles altos en el útero grávido, glándula mamaria y epidídimo de los rumiantes (Sanchis J., 2011).

La replicación del microorganismo en el retículo endoplasmático rugoso de los trofoblastos periplacentomales e intraplacentomales, genera una placentitis necrótico-purulenta que relaja la unión materno fetal disminuyendo así el intercambio gaseoso y nutritivo que se da a través de los cotiledones fetales, se produce una cotiledonitis y posterior expulsión del feto. (Sanchis J., 2011; Foster, R.A., 2012)

Para el diagnóstico el examen bacteriológico es de elección, sin embargo, es laborioso, costoso y no puede realizarse de rutina (Draghi M.G., 2001). Las pruebas serológicas son de uso cotidiano y detectan la infección de manera indirecta, se utiliza el Buffer Plate Antigen (BPA) como prueba tamiz, y Wrigth/Mercaptoetanol, fijación de complemento y la polarización fluorescente (FPA) como pruebas complementarias (Samartino, L., 2003).

***Leptospira* spp.:** es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Leptospira*, en general se subdividen en dos especies *L. biflexa* (no patógena) y *L. interrogans* (patógena), ésta última con el desarrollo de estudios de ADN está siendo subdividida en numerosas especies consideradas patógenas: *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. inadai* y *L. alexanderi* (Stanchi, N. et al., 2010). Es un agente ampliamente distribuido en el ambiente (Zimer, P.A. et al., 2016). Los serovares adaptados al bovino tienen tendencia a causar pérdidas reproductivas endémicas, mientras que las no adaptadas provocan altas tasas de abortos y grandes pérdidas económicas (Canton, G. et al., 2016). El aborto por *Leptospira* spp. se produce principalmente en los últimos estadios de la gestación, entre los 6 y los 9 meses y se da 1-6 semanas después de la fase aguda en caso de serovares accidentales y de 4-12 semanas en el caso de *L. hardjo*. (Alonso-Andicoberry, G. et al., 2001). Los serovares más importantes de *L. interrogans* asociado con el aborto bovino son *L. hardjoe* y *L. pomona*, más raramente los serovares *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippityphosa*. (Fernández, M.E. et al., 2007). El aborto se produce por la reacción sistémica general, por el paso de hemolisinas y otras toxinas a través de la placenta destruyendo los eritrocitos fetales y los cambios degenerativos microscópicos en la placenta interfieren en el intercambio fisiológico entre la madre y el feto, pudiendo originar la muerte fetal y expulsión luego de un tiempo medianamente prolongado.

Los signos de leptospirosis aguda, como fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y alta mortalidad suelen observarse en animales jóvenes. (Fernández, M.E. et al., 2007) El feto abortado en general se encuentra autolítico y presenta ictericia (Morrell, E., 2010), las lesiones que pueden encontrarse son: líquido sanguinolento en cavidades, hemorragia, y esplenomegalia. Los hallazgos histopatológicos son nefritis intersticial difusa y local, necrosis hepática centrolobulillar y en algunos casos lesiones vasculares en meninges y cerebro. (Odriozola, E., 2001) En vacas en lactancia, puede producir

disminución de la producción y mastitis (Fernández, M.E. et al., 2007). En la leptospirosis crónica, el aborto es el único signo que se observa en el rodeo (Morrell, E., 2010).

El diagnóstico se basa en la detección del agente de manera directa o indirecta a través de anticuerpos. La demostración de las *Leptospira* spp. en los fluidos corporales o en los órganos internos de fetos abortados o nacidos muertos tiene valor diagnóstico de leptospirosis crónica de la madre, y es una evidencia de la infección activa del feto. El aislamiento de *Leptospira* spp. es el método más sensible de la demostración del agente (OIE, 2004). Otra forma de observar la *Leptospira* spp. es a través de la inmunofluorescencia directa que se realiza sobre trozos de órganos o a partir de muestras de orina previamente centrifugada (Argento, E. et al., 1994). La serología es una herramienta fundamental que debe ser utilizada con precaución, es muy útil en la fase aguda de la infección ya que puede detectarse seroconversión positiva que indica la presencia del microorganismo, por el contrario en los casos crónicos tiene escaso valor ya que sólo indicaría que en algún momento existió contacto con el serovar reactante. (Argento, E. et al., 1994). Un diagnóstico de leptospirosis puede basarse en el hallazgo de títulos muy elevados en un animal con un cuadro clínico bien definido, existen reacciones serológicas cruzadas significativas entre serovares y serogrupos (Koval, A et al. 2007). Para efectuar el diagnóstico correcto es necesario conocer la dinámica de la infección y de esta manera seleccionar la muestra adecuada. (Argento, E. et al., 1994)

***Campylobacter fetus venerealis*:** La campylobacteriosis genital bovina es una enfermedad venérea causada por *Campylobacter fetus venerealis* que causa la muerte del embrión, abortos y reducción de la fertilidad en bovinos, este patógeno se encuentra altamente relacionado con *Campylobacter fetus fetus* que también puede provocar abortos ocasionales por infección materna de origen intestinal. (Morrell, E., 2010). La enfermedad en los toros es asintomática sin afectar su libido ni su fertilidad. Los signos de la enfermedad en el rodeo son, principalmente, repetición de servicios, celos irregulares y abortos (Campero, C.M., 2000). Los fetos abortados pueden estar frescos, autolíticos o momificados y ocasionalmente presentan lesiones que son inespecíficas sugiriendo infección bacteriana (Campero, C.M., et al., 2003). La invasión de *campylobacter* en la placenta causa edema del corioalantoide intercotiledonario, necrosis de los cotiledones y muerte fetal (Foster, R.A., 2012), el feto abortado puede estar fresco, autolítico o momificado.

El diagnóstico se puede realizar tanto en los machos como en las hembras, en los fetos y en el semen ya sea fresco o congelado. Es muy utilizada la técnica de Inmunofluorescencia directa (IFD) como método de “screening”, y el aislamiento por cultivo de *Campylobacter fetus*. Las muestras de elección son: el raspaje prepucial, mucus vaginal, pulmón y contenido de cuajo en fetos, así como también semen congelado o fresco. La inmunofluorescencia directa es una técnica sensible y específica pero tiene el inconveniente de no diferenciar subespecies de *Campylobacter fetus*. (Repiso, M.V., 2005). La técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se ha empleado en los últimos años para la detección de las subespecies de *C. fetus*, obteniéndose resultados aceptables en algunos casos y contradictorios en otros (Morrell, E., 2010).

Agentes Parasitarios:

***Neospora caninum*:** la neosporosis es reconocida como una importante causa de abortos en bovinos. Su ciclo de vida es heteroxeno siendo el perro (*Canis familiaris*) y el coyote (*Canis latrans*) los hospedadores definitivos reconocidos hasta el presente. En el ciclo biológico se reconocen tres estadios diferentes: los taquizoítos, los bradizoítos contenidos en quistes tisulares y los esporozoítos encontrados en los esporocistos de los ooquistes. Los bovinos se infectan por vía transplacentaria o por transmisión horizontal mediante la ingestión de ooquistes provenientes de contaminación con heces de los huéspedes definitivos. (Moore, D.P., et al., 2006) La infección congénita es considerada la forma más eficiente de transmisión y persistencia de la neosporosis en los rodeos, mientras que la horizontal parece ser poco relevante en rodeos con abortos enzoóticos (Echaide, I., 2000).

Rara vez se asocia a la neosporosis con signos clínicos; el más común y muchas veces el único es el aborto, generalmente entre el mes 5 y 8 de gestación (Bacigalupe, D.R., 2008). La fisiopatología del aborto causado por *N. caninum* todavía no es clara (Moore, D.P. et al., 2005). El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse, o expulsarse con avanzado grado de autólisis. Puede acontecer el nacimiento del ternero crónicamente infectado (Moore, D.P. et al., 2001), nacer infectado muerto, enfermo o infectado y clínicamente sano. Estos últimos durante las primeras semanas de vida pueden mostrar signos de lesiones neuromusculares en incluso morir, hecho que se da en muy pocas ocasiones. Después del aborto la fertilidad no se ve afectada dado que normalmente no deja secuelas. (Echaide, I., 2000), esto contribuye a la permanencia de la enfermedad en el rodeo.

El diagnóstico de Neosporosis bovina puede ser por métodos directos e indirectos. Para lograr el diagnóstico definitivo es necesario el aislamiento, a partir de tejidos fetales en cultivos celulares, pero el éxito es muy bajo, ya que la autólisis de las células hospedadoras produce la muerte del parásito. Para el diagnóstico directo se han desarrollado técnicas de PCR y también puede realizarse inmunohistoquímica de corazón y cerebro de fetos abortados. Estas técnicas ponen en evidencia la infección, pero la sola presencia del parásito no significa que éste sea el causante del aborto ya que existe un porcentaje elevado de terneros con infección congénita que se desarrollan normalmente. (Echaide, I., 2000).

En casos donde se sospecha de *N. caninum* como agente causal del aborto es importante la observación de lesiones como meningoencefalitis necrotizante multifocal, miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares. (Moore, D.P. et al., 2005)

Las pruebas diagnósticas más utilizadas son la inmunofluorescencia y el enzimo-inmuno ensayo (ELISA), que detectan la enfermedad de manera indirecta, utilizando líquidos y suero fetales, además de suero materno y de animales que no abortaron. Estas pruebas son muy útiles para el diagnóstico en rodeos donde la enfermedad no es endémica y deben utilizarse con cautela en rodeos endémicos. La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en vacas abortadas no confirma que ésta sea la causa. La respuesta serológica es diferente en rodeos con abortos enzooticos y rodeos con abortos epizooticos, ya que en los últimos se observan mayores títulos en inmunofluorescencia. (Echaide, I., 2000). La detección de anticuerpos en fluidos fetales demuestra la infección congénita, pero no es un elemento suficiente para afirmar que el aborto fue causado por *N. caninum* ya que también se debe constatar la presencia de lesiones histopatológicas específicas en los fetos. (Calandra, P. et al., 2014)

***Trichomonas foetus*:** La trichomoniasis bovina es una enfermedad parasitaria producida por *Trichomonas foetus*, protozoo tricomonadido que vive en el sistema urogenital del bovino. (Vignau, M.L. et al., 2005). Este agente se caracteriza por producir pérdidas reproductivas tempranas manifestadas con infertilidad transitoria, mortalidad embrionaria, repetición de celos, piómetras y abortos esporádicos. (Campero, C.M., 2000). La enfermedad se transmite por vía sexual que puede ser por servicio natural o

inseminación artificial, ya que el parásito puede permanecer viable en semen congelado infectado. (Cobo, E.R. y Campero C.M., 2002).

El mecanismo de acción patógena es la adherencia a células del tracto reproductor y posterior daño tisular que en la hembra se presenta como endometritis, cervicitis, salpingitis y vaginitis con la posterior repetición de celo. (Monteavaro, C. et al., 2016).

Las lesiones placentarias y fetales antes del día 60 de gestación son mínimas, permitiendo mantener la gestación normalmente. Sin embargo, luego de dicho período, induce una reacción inflamatoria en los placentomas (cotiledones y carúnculas) que se correlaciona con el aborto y ocurre usualmente antes del 7° mes de preñez. (Cobo, E.R. y Campero, C.M., 2002).

La exposición a *T. foetus* en el área genital del bovino induce la formación de anticuerpos locales, los que no siempre son suficientes para liberar de la infección al huésped, especialmente en el macho en el que es crónica. La vaca que se infecta por primera vez adquiere cierta inmunidad pasajera que en el mejor de los casos no supera los 9 meses pudiéndose luego reinfectarse (Campero, C.M., 2000). La duración de la infección en la hembra se estima frecuentemente alrededor de los 90 días para que se establezca definitivamente la inmunidad. La función normal del útero tiende a restablecerse entre los 2 y 5 meses posteriores al aborto. (Vignau, M.L. et al., 2005).

El diagnóstico se basa en la historia clínica, síntomas de aborto prematuro, revisiones repetidas, o ciclos de celo irregulares. La confirmación depende de la demostración de los microorganismos en el líquido placentario, el contenido estomacal de los fetos abortados, los lavados uterinos, el flujo piometral o el mucus cervico-vaginal y esmegma prepucial. Normalmente es necesario el cultivo de los microorganismos porque, en la mayoría de los casos, el número de microorganismos no es suficientemente grande para hacer un diagnóstico positivo mediante un examen directo (OIE, 2004). Como complemento la observación directa se puede observar la morfología de estos flagelados mediante la coloración de May Grünwald-Giemsa.

Agentes virales:

Herpes Virus Bovino tipo I (HVB-I): Es el causante de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), vulvovaginitis postular infecciosa, balano-postitis y abortos. (Galosi C., 2010). El 90 % de los establecimientos tienen por lo menos algún animal infectado, lo que indica, que el virus circula en casi toda la población de bovinos. (Alonso, P., 2005).

La enfermedad respiratoria se da luego de un período de incubación de 3 a 6 días y se puede observar, conjuntivitis, exudado nasal seromucoso y traqueítis. La vulvovaginitis se caracteriza por la presencia de pústulas en la vulva que se encuentra edematizada e hiperémica, acompañada de descargas mucopurulentas. En la balanopostitis se observa hiperemia de la mucosa genital acompañada de pústulas que pueden llegar a ulcerarse. Los abortos pueden producirse entre el mes 4 y 7 de gestación y comienzan luego de observarse signos respiratorios. (Galosi, C., 2010).

A nivel respiratorio, el virus destruye el epitelio del tracto superior lo que, sumado a la inmunosupresión que provoca en el organismo, favorece el asentamiento de infecciones bacterianas secundarias. En relación al tema del aborto, existen datos experimentales y de campo que sugieren que el virus permanece latente en la placenta, se reactivaría, invadiría el feto y ocasionaría su muerte produciendo lesiones necróticas diseminadas (Pidone, C. et al., 1999). La serología materna no es de gran utilidad debido a que no existe correlación entre los títulos de anticuerpos encontrados en el momento del aborto aunque la serología pareada puede utilizarse en rodeos que no han tenido exposición previa o no han sido vacunados. (Morrell, E., 2010).

Para su diagnóstico pueden utilizarse deferentes técnicas; el aislamiento se realiza sobre cultivos primarios de origen bovino y células de línea MDBK, (Galosi, C., 2010). La inmunofluorescencia directa es muy empleada y su principal ventaja es la rapidez, pero carece de sensibilidad respecto al aislamiento. La prueba serológica de elección es el ELISA ya que posee alta sensibilidad y especificidad y su costo es accesible, la técnica debe estar muy bien estandarizada. (Pidone, C. et al., 1999). La seroneutralización se utiliza también para detectar y titular anticuerpos (Galosi, C., 2010), la inmunohistoquímica, empleando anticuerpos monoclonales, ha probado ser tanto o más sensibles que las técnicas convencionales, es una técnica rápida y no requiere de cultivos celulares. (Pidone, C. et al., 1999). La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es tan sensible como el aislamiento viral y es una práctica rápida para la detección del BHV-1.

Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB): La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas (Létora, W., 2016), la característica principal de éste virus es su variabilidad genética que le permite generar cepas mutantes y escapar a la respuesta inmunológica del huésped (Valera, A., 2010). Existen marcadas diferencias en la virulencia de una cepa y otra, pasando así como infecciones inaparentes o llegar a tener un final fatal. (Létora, W., 2016). La enfermedad se

transmite por contacto directo o indirecto entre animales, infección transplacentaria o transmisión sexual debido al semen de un toro infectado (Morrell, E., 2010). En cuanto a los aspectos reproductivos este virus puede causar abortos, nacimiento de terneros débiles o con daño cerebral, incoordinación y ceguera o con escaso desarrollo corporal (Campero, C.M., 2000), momificación, fallas en la reproducción e inmunosupresión (Morrell, E., 2010). Durante la preñez, la infección puede dividirse en cuatro etapas en base a las manifestaciones clínicas que produce:

- Etapa embrionaria: El virus no tiene efecto hasta el día 8-9 en que el embrión pierde la zona pelucida.

- Días 45 a 125 de gestación: es una etapa esencial para la infección y persistencia del virus ya que el ingreso de una cepa no citopática en esta etapa culmina con el nacimiento de animales inmunotolerantes, persistentemente infectados.

- Días 125 a 175: comienza la inmunocompetencia fetal frente al virus. Pueden producirse abortos o malformaciones ya que se está llevando a cabo la organogénesis.

- Días 175 en adelante: el resultado de infecciones en este período son animales seropositivos o débiles, mientras que los abortos son ocasionales. (Valera A. 2010).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en el aislamiento viral o bien en la presencia de seroconversión de muestras dobles de hembras sospechosas o abortadas (Campero C.M., 2000). Utilizando un ELISA que detecta anticuerpos específicos (IgM) contra DVB puede suponerse la reciente exposición al virus (Morrell, E., 2010).

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

El aborto es un desafío tanto para el veterinario de campo como para el laboratorista, ya que las probabilidades de arribar a un diagnóstico son bajas (44.2%) (Khodakaram-Tafti, A. & Ikede, B.O., 2005) 50% (Morrell, E., 2010) 23% (Combessies, G., 2015). El presente trabajo tiene por finalidad resaltar la importancia del diagnóstico de laboratorio como herramienta importante para arribar al diagnóstico definitivo en un problema reproductivo de una explotación bovina.

DESCRIPCIÓN DEL ESTABLECIMIENTO Y SU UBICACIÓN GEOGRAFICA

El establecimiento Santa María-San José, (georeferencia 33° 05' 58.30" S 63° 36' 55.18" O) se encuentra ubicado a 20 kilómetros al sur de la localidad de Ucacha, departamento Juarez Celman, en el centro-sur de la provincia de Córdoba. Presenta un clima templado sub-húmedo, la temperatura media anual de la zona es de 16,8 C°, pudiendo alcanzar mínimas absolutas en los meses de julio-agosto (temporada fría) de -10 C° y máximas en los meses cálidos diciembre-enero de 40 C°. Las heladas se producen en promedio desde el 25 de mayo hasta el 19 de septiembre (promedio 105 días). Las precipitaciones anuales son de 766 milímetros, distribuidos en un semestre lluvioso (octubre a marzo) y un semestre seco (abril a septiembre). El área fue declarada en emergencia agropecuaria por anegamiento de suelos por lluvias en el ciclo productivo 2015/2016.

El establecimiento se dedica exclusivamente a la producción láctea. En los últimos 13 meses tuvo en promedio 220 vacas en producción con un promedio de 23 litros por animal por día, haciendo un promedio de producción de 5137,76 litros por día.

Los servicios se realizan por medio de inseminación artificial comenzando el día 1 de mayo y finalizando el día 1 de diciembre. Desde éste día hasta el 28 de febrero se da servicio a campo con toros. Durante los meses de marzo y abril no hay ningún tipo de servicio.

El diagnóstico de preñez se realiza mediante ultrasonografía cada 14 días.

El plan sanitario cuenta con la aplicación de las vacunas obligatorias, Brucelosis en terneras y vacunación anual contra Aftosa. No se utilizan vacunas reproductivas, ni de ningún otro tipo.

El establecimiento se encuentra libre de brucelosis y tuberculosis.

OBJETIVO GENERAL

Resaltar el valor del diagnóstico de laboratorio como herramienta en el caso problema de síndrome de aborto bovino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el caso problema de síndrome abortivo en bovinos:

-Realizar un protocolo de toma y envío de muestras adecuado al caso problema

-Aplicar las técnicas de laboratorio para detectar: Brucelosis, Neosporosis, Leptospirosis, Virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), Trichomoniasis y Campylobacteriosis.

-Interpretar los resultados de laboratorio y relacionarlos con los hallazgos clínicos y la epidemiología de las enfermedades.

-Resaltar la importancia de un trabajo conjunto entre el veterinario clínico y el laboratorio para arribar al diagnóstico definitivo.

HIPOTESIS:

En el caso problema de síndrome de aborto bovino planteado, los resultados que arrojan las pruebas de diagnóstico de laboratorio y su interpretación, deben relacionarse con la anamnesis y la observación del veterinario clínico, en el contexto epidemiológico de la/s enfermedad/es actuante/s.

MATERIALES Y METODOS

Descripción del caso problema

En el mes de marzo/2017 se reporta una disminución de terneros nacidos en el establecimiento Santa María-San José, se informa que entre los meses de enero, febrero y marzo se registraron 33 abortos, los mismos se incrementaron en el tiempo y se concentraron en marzo.

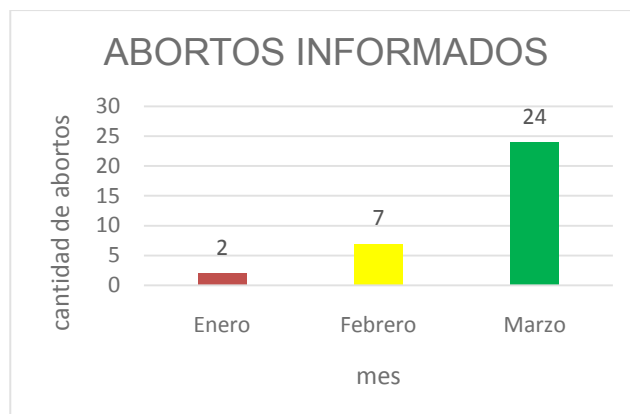


Grafico 1: Distribución de los abortos informados en los meses de enero, febrero y marzo.

El día 5 de marzo se realizó tratamiento de animales con mastitis y algunos de ellos presentaban sangre en orina y leche. En los días posteriores se observaron signos de diarrea y aumento de temperatura en terneros.

El Laboratorio Mafrand de la localidad de Rio Cuarto, Córdoba, recibió muestras en 2 protocolos de envió:

Primer protocolo, se recibió el 16 de marzo muestras de sangre pertenecientes a 18 hembras de diferentes categorías (8 abortadas y 10 no abortadas).

Se procedió a realizar el protocolo de síndrome de aborto Bovino, el mismo consta de la determinación de:

- Brucelosis: Técnicas de Antígeno Buferado en Placa (BPA) y Fluorescencia Polarizada (FPA)
- Neosporosis: Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- Leptospirosis: Microaglutinación (MAT)
- Virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR): ELISA
- Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB): ELISA
- Bacteriología (no se realizó trichomoniasis ni campylobacteriosis ya que las muestras no eran las adecuadas).

El desarrollo de las técnicas de diagnóstico empleadas se describe detalladamente en el ANEXO 1.

Segundo protocolo: transcurridos cuatro días del envío para el primer protocolo, se recibió un segundo envió de un feto abortado de 6 meses de gestación y muestras de sangre y orina de cinco vacas abortadas.

Para el segundo protocolo (conociendo los resultados del primero) se realizó la determinación de:

- Leptospirosis en suero y orina de vacas abortadas, por las técnicas de Inmunofluorescencia directa (IFD) en orina y MAT en suero.
- Neosporosis en los sueros de vacas abortadas por IFI
- Leptospirosis y Neosporosis en líquidos de cavidades fetales por MAT e IFI respectivamente
- Necropsia al feto
- Trichomoniasis, Campylobacteriosis y Bacteriología en líquidos de cavidades fetales

La metodología utilizada para cada determinación se describe en el ANEXO 1.

La necropsia del feto se realizó siguiendo el protocolo interno del laboratorio que se describe en el ANEXO 2.

RESULTADOS

Primer Protocolo de muestras

Brucelosis: En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de BPA de las 18 muestras de suero y FPA realizado a una muestra que fue positiva a BPA.

Tabla 1

N°muestra	BPA	FPA	Diagnóstico
2435	Negativo		Negativo
2665	Positivo	Negativo	Negativo
2742	Negativo		Negativo
2753	Negativo		Negativo
3036	Negativo		Negativo
2958	Negativo		Negativo
3083	Negativo		Negativo
3101	Negativo		Negativo
2981	Negativo		Negativo
2991	Negativo		Negativo
3003	Negativo		Negativo
2825	Negativo		Negativo
2559	Negativo		Negativo
3012	Negativo		Negativo
2985	Negativo		Negativo
2758	Negativo		Negativo
2733	Negativo		Negativo
2946	Negativo		Negativo

IBR y DVB: En la Tabla 2 se muestran los resultados a las pruebas de ELISA para los virus de IBR y DVB.

Para IBR, los resultados se expresa en Índice Relativo Por Cien (IRPC).

Valor de IPCR	Resultado
Menor o igual a 9	Negativo
Mayor a 9 y menor o igual a 15	Sospechoso

mayor a 15	Positivo
------------	----------

Para DVB, los resultados se informan en porcentajes de inhibición.

% inhibición	Resultado
inferior a 50	Negativo
mayor o igual a 50 y menor a 80	Positivo bajo
mayor o igual a 80	Positivo alto

Tabla 2

N°muestra	IBR (IRPC*)	DVB (% Inhibición)
2435	Negativo	Positivo (88)
2665	Negativo	Positivo (50)
2742	Positivo (33)	Positivo (59)
2753	Negativo	Positivo(68)
3036	Negativo	Positivo (81)
2958	Negativo	Positivo (55)
3083	Positivo (47)	Negativo
3101	Negativo	Positivo (68)
2981	Positivo (50)	Positivo (66)
2991	Negativo	Positivo (68)
3003	Negativo	Negativo
2825	Negativo	Positivo (53)
2559	Negativo	Positivo (78)
3012	Negativo	Positivo (69)
2985	Negativo	Positivo (84)
2758	Negativo	Positivo (87)
2733	Sospechoso (12)	Positivo (70)
2946	Negativo	Positivo (67)

*IRPC: El resultado se expresa en Índice Relativo Por Cien (IRPC).

Leptospirosis: En la Tabla 3 se muestran los títulos serológicos de *Leptospira* spp. obtenidos por la técnica de MAT.

Tabla 3

N°muestra	<i>L. pomona</i>	<i>L. wolffi</i>	<i>L. hardjo</i>	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	<i>L. tarassovi</i>
2435	-	-	-	-	-
2665	≥ 3200	1/200	-	1/200	-
2742	1/200	-	-	-	-
2753	1/800	-	-	-	-

3036	1/1600	1/200	1/400	1/400	-
2958	-	-	-	-	-
3083	-	-	-	-	-
3101	1/400	-	-	-	-
2981	1/200	-	-	-	-
2991	1/800	-	-	-	-
3003	1/1600	-	-	-	-
2825	1/800	-	-	-	-
2559	≥ 3200	-	-	-	-
3012	≥ 3200	1/200	1/200	1/200	-
2985	≥ 3200	-	1/200	-	-
2758	1/1600	-	-	-	-
2733	1/200	-	-	-	-
2946	-	-	-	-	-

Neosporosis: En la Tabla 4 se muestran los títulos serológicos a *Neospora caninum* obtenidos por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 4

N°muestra	Título
2435	Positivo ≥ 1/1200
2665	Negativo
2742	Positivo ≥ 1/1200
2753	Positivo ≥ 1/1200
3036	Negativo
2958	Negativo
3083	Negativo
3101	Negativo
2981	Negativo
2991	Negativo
3003	Negativo
2825	Positivo ≥ 1/1200
2559	Negativo
3012	Negativo
2985	Positivo ≥ 1/1200
2758	Negativo
2733	Negativo
2946	Positivo ≥ 1/1200

Segundo Protocolo de muestras

Leptospirosis: En la Tabla 5 se muestran los títulos serológicos obtenidos por la técnica de MAT en suero de vacas abortadas.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos por Inmunofluorescencia directa en orina de vacas abortadas.

En la Foto 1 se observa la Inmunofluorescencia directa de *Leptospira* spp.

En la Tabla 7 se muestran los títulos serológicos obtenidos por la técnica de MAT en líquidos de cavidad fetal.

Tabla 5

N°muestra	L. pomona	L. wolffi	L.hardjoe	L. icteroh.	L.tarassovi
2334	1/800	-	-	-	-
2959	1/1600	-	-	-	-
2884	1/800	-	-	-	-
2409	1/1600	-	-	-	-
2941	1/800	-	-	-	-

Tabla 6

N°muestra	Título
2334	Positivo
2959	Positivo
2884	Negativo
2409	Negativo
2941	Negativo

Foto 1

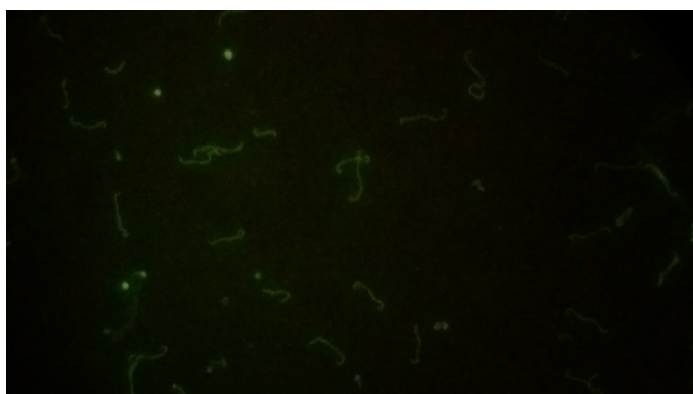


Tabla 7

N°muestra	L. pomona	L. wolffi	L.hardjoe	L. icteroh.	L.tarassovi
Abdominal	1/1600	-	-	-	-

Torácica	1/3200	-	-	-	-
----------	--------	---	---	---	---

Neosporosis: En la Tabla 8 se muestran los resultados de *N. caninum* obtenidos por la prueba de inmunofluorescencia indirecta en suero de vacas abortadas.

En la Tabla 9 se muestran los resultados de *N. caninum* obtenidos por prueba de inmunofluorescencia indirecta en líquidos de cavidad fetal

Tabla 8

N°muestra	Título
2334	Positivo \geq 1/1200
2959	Negativo
2884	Negativo
2409	Negativo
2941	Positivo \geq 1/1200

Tabla 9

Muestra	Título
Abdominal	Negativo
Torácica	Negativo

***Trichomonas foetus*:** No se observó desarrollo de formas compatibles con *T. foetus*.

***Campylobacter foetus*:** No se observó formas compatibles con *Campylobacter foetus*.

Bacteriológico: No se observó desarrollo en los medios probados.

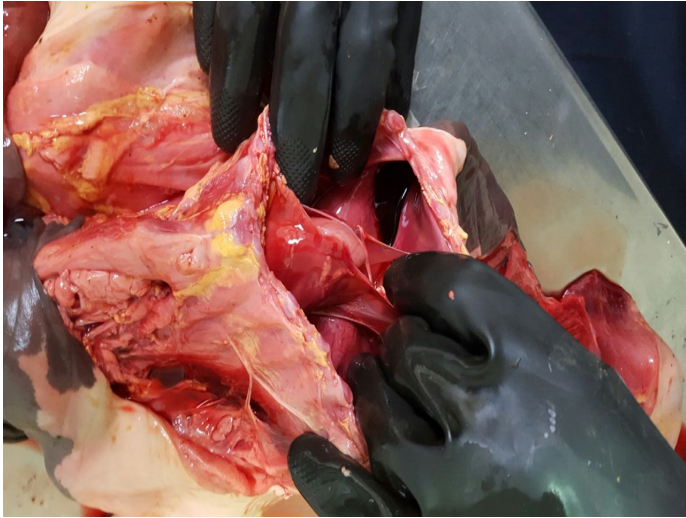
En la necropsia se observó subcutáneo edematoso, grasa subcutánea icterica (Foto 1) presencia de líquido sanguinolento en cavidades abdominal y torácica (Foto 2), los riñones se encontraban friables y con ictericia en la grasa peri renal. El hígado se apreciaba normal

en tamaño y consistencia. Los pulmones y corazón no presentaban alteraciones. El sistema nervioso no presentaba lesiones visibles macroscópicamente.

Foto 1: subcutáneo edematoso y grasa ictérica.



Foto 2: líquido en cavidad torácica



DISCUSIÓN

Los resultados del primer protocolo realizados sobre suero de vacas abortadas y no abortadas permitieron descartar algunas enfermedades y orientar el diagnóstico. Es fundamental el envío de muestras de animales no abortados para la interpretación de los resultados. Todos los animales muestreados fueron negativos a brucelosis, en el caso de un individuo que reaccionó positivo a la prueba de BPA se descartó la infección a través de la técnica de FPA que aporta mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico. Es un establecimiento libre de brucelosis

En la prueba de microaglutinación para leptospirosis, 14/18 animales presentaron títulos de anticuerpos, en su totalidad frente a *L. Pomona* (Grafico 1). Asimismo, 4/14 reaccionaron frente a otros serovares, lo que coincide con lo expresado por Koval, A. (2007) en cuanto a la existencia de reacciones cruzadas entre los diferentes serovares. Se observó que los títulos a *L. Pomona* fueron en su mayoría elevados.

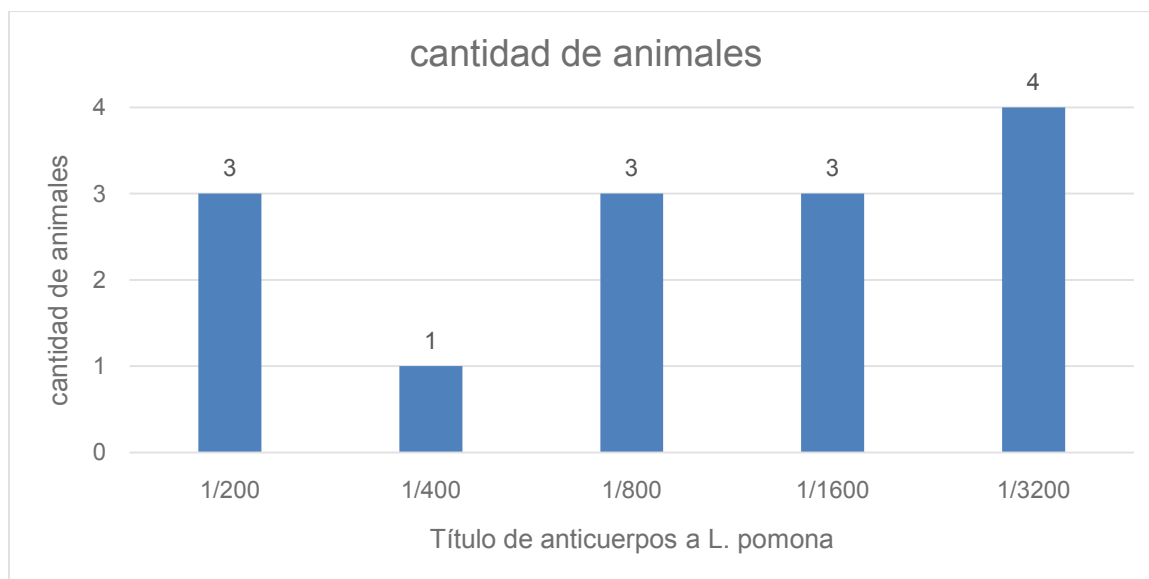


Gráfico 1: Titulación de anticuerpos para *L. Pomona*.

Coincidiendo con lo expuesto por Argento, E. (1994), en este caso la serología cobra importancia, ya que el hecho de que existan títulos altos de anticuerpos frente a algún serovar puede ser indicativo de infección reciente, además al haber diferentes títulos indica que el agente puede seguir presente en el rodeo. La presencia de signos clínicos como hematuria, mastitis con secreción sanguinolenta y abortos con retención de placenta acompañados de títulos serológicos altos puede ser indicativo de infección (Koval, A., 2007).

Los resultados obtenidos en la prueba de inmunofluorescencia indirecta para determinación de *N. caninum*, demuestran que 6/18 vacas poseen anticuerpos frente a *N. caninum* y todas ellas presentan títulos elevados ($\geq 1/1200$), que de todas formas y en coincidencia con Echaide, I. (2000), no confirman la infección, y deben interpretarse con cautela, ya que pueden deberse a infecciones pasadas o tratarse de un rodeo endémico, en el que un porcentaje de animales presenta altos títulos de anticuerpos sin haber existido una exposición reciente al parásito. En este caso hubiese sido de gran utilidad realizar muestreos pareados para ver la existencia de seroconversión, positiva en caso de los animales negativos a la prueba y negativa en los que se encuentran títulos altos.

Para dar un diagnóstico de *N. caninum* por inmunofluorescencia indirecta y tomar a ésta como agente causal del aborto deben existir, según Moore, D.P. (2010) y Calandra, P.M. (2014), además de títulos altos y seroconversión, signos y lesiones compatibles en fetos abortados, que no se observaron en este caso.

La determinación de HVB-I por la técnica de ELISA demuestra que 3/18 animales presentan anticuerpos frente al virus y 1/18 es sospechoso, los mismos podrían deberse a contacto previo con el agente, ya que de acuerdo a lo observado por Alonso, P (2005) un alto porcentaje de rodeos presenta animales positivos. En este caso no puede sospecharse de anticuerpos vacunales ya que en el establecimiento no se realizan vacunaciones frente a enfermedades reproductivas.

Para la determinación de Diarrea Viral bovina se observa que 16/18 animales presentaban anticuerpos y 4/16 fueron considerados como positivos altos. Al igual que en lo expresado en IBR, muchos rodeos son serológicamente positivos a DVB, sin que esto signifique causal de aborto.

Por los resultados obtenidos en este primer protocolo de muestras, podemos inferir en un diagnóstico presuntivo de Leptospirosis o Neosporosis. Lamentablemente, en ninguna de las dos patologías se demostró el agente.

Con este diagnóstico presuntivo, se decide procesar las muestras de sangre y feto abortado del segundo protocolo en busca de Leptospirosis o Neosporosis.

La inmunofluorescencia indirecta para *N. caninum* de dos de los animales que abortaron, es un indicio de que en el rodeo existe la enfermedad. Al no encontrarse anticuerpos anti- *N. caninum* en los líquidos fetales, no pudo demostrarse la infección fetal, sin embargo, no por esto debe descartarse la posibilidad de presencia de esta enfermedad.

Los resultados de Leptospirosis muestran que serológicamente 5/5 animales presentan anticuerpos frente al serovar *L. pomona*, todos ellos con títulos altos. Además se observaron títulos altos frente a este serovar en los líquidos de cavidad abdominal y torácica fetales. Esto último es lo que demuestra según la OIE (2004) la infección activa del feto.

La inmunofluorescencia directa en orina de vacas abortadas indica la presencia microorganismos morfológicamente compatibles con *Leptospira spp.*

Estos resultados podrían confirmar el diagnóstico presuntivo de Leptospirosis, aunque no se haya realizado el aislamiento, pero los datos analizados con criterio clínico y teniendo en cuenta los datos epidemiológicos aportados por el Médico Veterinario actuante sirvieron para proceder terapéuticamente y lograron solucionar el problema planteado.

Por otra parte, los resultados a *N. caninum* dejan un interrogante porque si bien no se pudieron demostrar lesiones compatibles en fetos, queda claro que el rodeo está en contacto con el parásito, esto en coincidencia con lo expuesto por Echaide, I. (2000) sugiere que la presencia de *N. caninum* en rodeos con problemas de abortos no significa que éste sea el agente causal.

En ambas patologías: Neosporosis y Leptospirosis hubiese resultado significativo la realización de muestreos pareados para observar seroconversión. Sin embargo, por cuestiones operativas del establecimiento esta práctica no fue posible.

El caso planteado demuestra la importancia que tiene la realización de una buena anamnesis por parte del veterinario de campo y el envío pertinente y adecuado de las muestras al laboratorio. La observación y capacidad de relacionar los datos clínicos y epidemiológicos con los resultados obtenidos por el laboratorio de diagnóstico, sumado a la comprensión de la dinámica de las enfermedades, son las variantes que debe manejar todo veterinario para lograr arribar al diagnóstico de un problema, en este caso un síndrome de aborto bovino.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Ortega-Mora, L.M. (2001). Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim., 16, 205-225.
- Alonso, P. (2005). IBR, cuadros clínicos relacionados a la enfermedad. Extraído de: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/81-ibr.pdf
- Argento, E., Draghi, M.G., Saraví, M. (1994). Manual de Leptospirosis. Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.
- Bacigalupe, D.R. (2008). Actualización sobre neosporosis en bovinos, primera parte. Veterinaria Cuyana. Año 3 número 1 y 2, 23-28.
- Calandra, P.M., Di Matía, J.M., Canoa, D.B., Odriozola, E.R., García, J.A., Spätha, E.J.A., Odeón A.C., Paolicchia, F.A., Morrella E.L., Campero, C.M., Moore, D.P. (2014). Neosporosis epidémica y endémica: descripción de dos eventos en bovinos para cría. Revista argentina de microbiología 46 (4): 315-319.
- Campero, C.M. (2000). Las enfermedades reproductivas en los bovinos: ayer y hoy. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ISSN: 0327-8093) p.p. 88-114
- Campero, C.M. (2006). Causas infecciosas y parasitarias del aborto bovino. MG Mundo ganadero, 17(191), 31-35.
- Campero, C.M., Moore, D.P., Odeón, A.C., Cipolla, A.L., Odriozola, E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. Veterinary Research Communications, 27(5), 359-369.
- Canton, G., Fiorentino, A., Moreira, A., Hecker, Y., Moore, P., Paolicchi, F., Lischinsky, L., Licoff, N., Odeon, A., Odriozola, E., Morrel, E., Brihuega, B. (2016). XXI reunión científico técnica Dr Bernardo Jorge Carrillo. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (San Salvador de Jujuy 6-7-8 de octubre 2016)
- Cobo, E.R, & Campero C.M. (2002). Nuevos aspectos inmunológicos y vacunales de la trichomoniasis bovina. Recuperado de: http://www.produccionbovina.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/02-tricomoniasis.pdf
- Combessies, G. (2015). Aborto Bovino: diagnóstico etiológico y metodología de las causas infecciosas realizadas en Laboratorio Azul. Noticias Laboratorio Azul.

-De Luca, L.J. (2002). Laboratorios Burnet. Aborto bovino; causas, frecuencia, etiopatogenia, inmunidad. Recuperado de: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/37-aborto_bovino.pdf

-Di Cola, G. (2014). Toma y remisión de muestras al laboratorio para diagnóstico de problemas sanitarios. Información Veterinaria, CMVPC, Córdoba, Argentina, N° 176: 47-51.

-Draghi M.G., (2001). Una enfermedad infecto-contagiosa. Brucelosis. Recuperado de: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/39-brucelosis.pdf

-Echaide, I. (2000). Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino. FAV UNRC, Río Cuarto, República Argentina.

-Fernandez, M.E., Campero, C.M., Morrell, E., Cantón, G.J., Moore, D.P., Cano, A., Odriozola, E.R. (2007). Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. Rev Med Vet, 88, 246-254.

-Foster, R.A. (2012). Female Reproductive System and Mammary Gland. En: Pathologic Basis of Veterinary Disease. Fifth Edition. Zachary J.F., Mc Gavin M.D. ELSEVIER, St Louis, Missouri. pp 1085.

-Galosi C.M. (2010). Herpesvirus. En Martino EP., Gentilini E., Reinoso EH., Echeverría MG., Leardini NA., Copes JA (eds). Microbiología Veterinaria. Editorial Intermedica, Buenos Aires. pp 378-381.

-Khodakaram-Tafti, A., & Ikede, B.O. (2005). A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, 1990 to 2001. Canadian veterinary journal, 46(7): 635.

-Koval, A., López, S., Nardello, M., Vena, M.M., Margueritte, J. (2007). Aislamiento, tipificación y evaluación de la capacidad inmunogénica y de protección cruzada de una cepa de *Leptospira interrogans* perteneciente al serogrupo Pomona. Vet. Arg. Vol. XXIV. N° 235.

-Lértora, W.J. (2016). Diarrea viral bovina: actualización. Revista Veterinaria 14 (1): 42-51.

-Moore, D.P., Odeón, A.C., Venturini, M.C., Campero, C.M. (2005). Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista argentina de microbiología, 37(4): 217-228.

-Moore, D.P., Venturini, M.C., Campero, C.M. (2006). Avances en la neosporosis bovina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Tomo LX. (ISSN 0327-8093)

-Moore, D.P., Odeón, A.C., Campero, C.M. (2001). Neosporosis bovina: una actualización. Veterinaria argentina, 18 (180): 752-775.

-Morrell, E. (2010). Caracterización diagnóstica de las causas infecciosas del aborto bovino. Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

- Monteavaro, C., Doumecq, M.L., Cacciato, C. Falcon, J.E., Soto, P., Barbeito C. (2016). Evaluación de aislamientos de *Trichomona foetus* sobre el modelo Murino de gestación. XXI reunión científico técnica Dr Bernardo Jorge Carrillo. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (San Salvador de Jujuy 6-7-8 de octubre 2016)

-OIE Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Cap 2.3.6 pp 526-531.

-Pidone, C.L., Galosi, C.M.; Etcheverrigaray, M.E. (1999). Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta veterinaria* 19.

-Odriozola, E. (2001). Leptospirosis. Extraído de: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/62-leptospirosis.pdf

-Repiso, M.V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernandez, L., Guarino, H., Herrera, B., Nuñez, A., Olivera, M., Osawa, T., Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo), 40(157): 5-28.

-Respaldiza, E. (2009). Situación actual y programas de control y erradicación del IBR en España. *Albéitar: publicación veterinaria independiente* 131: 4-7.

-Rivera, H. (2001). Causas frecuentes de aborto bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2): 117-122.

-Samartino, L. (2003) Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

-SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria) 2006. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/16-brucelosis.pdf

Sanchis, J. (2011). Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnosticas de la Brucelosis bovina, ovina y caprina. Extraído de: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/117-Cuestiones_clinicas.pdf

-Stanchi, N., Brihuega, B., Gatti, E. (2010). Leptospiras. En Martino EP., Gentilini E., Reinoso EH., Echeverría MG., Leardini NA., Copes JA (eds). *Microbiología Veterinaria*. Editorial Intermedica, Buenos Aires. pp 320-325.

-Vignau, M.L., Venturini, L.M., Romero, J.R., Eiras, D.F., Basso, W.U. (2005). Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

-Thurmond, M.C. & Picanso, J.P. (1990). A surveillance system for bovine abortion. Preventive Veterinary Medicine, 8(1): 41-53.-Tizard, I. (2009). Inmunología Veterinaria. (8ta ed.) Elsevier Saunders.

-Valera, A. (2010). Flavivirus. Capítulo 74 En Martino EP., Gentilini E., Reinoso EH., Echeverría MG., Leardini NA., Copes JA (eds). Microbiología Veterinaria. Editorial Intermedica, Buenos Aires. pp 447-451

-Zimmer, P.A., Biotti, G.M., Draghi, M.G., Brihuega, B.F. (2016). Valor diagnóstico del antígeno termo resistente para determinar anticuerpos anti-leptospira en suero de vacas abortadas. XXI reunión científico técnica Dr Bernardo Jorge Carrillo. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (San Salvador de Jujuy 6-7-8 de octubre 2016)

ANEXO 1

Metodología empleada para cada determinación de laboratorio (Extraído de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

Leptospirosis: se realiza por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) y por serología por microaglutinación (MAT)

Técnica de IFD: Esta técnica tiene como objetivo poner en evidencia la presencia de Leptospiras por medio de la utilización de anticuerpos marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FICT), que se unen a la bacteria y producen fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta. Es una técnica rápida y relativamente sencilla.

Muestras:

- Sangre heparinizada o con EDTA (Durante los primeros 7 días de infección) generalmente cuando responden con títulos altos serológicamente y a varios serovares).

- Orina (después de los 20 días de infección) o en vacas recientemente abortadas.

- Improntas de riñón o hígado de fetos abortados o animales muertos.

Procedimiento: (Extraído de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

- Efectuar improntas sobre portaobjetos de Inmunofluorescencia.

- Secar al aire y fijar en acetona en freezer a -20°C

- Secar al aire

- Colocar una gota de conjugado a la dilución de uso. El conjugado se diluye con PBS pH 7,2.

- Incubar 45 minutos en cámara húmeda a 37°C .

- Lavar 5 minutos en agua destilada.

- Montar con glicerina bufferad.

- Leer con microscopio de fluorescencia con objetivo de 100 X.

Prueba de microaglutinación (MAT): es la prueba serológica de referencia. Se buscan anticuerpos contra los serovares que puedan estar presentes en la zona de estudio y que tengan importancia en la especie bovina, para su realización se utiliza suero de los animales abortados y no abortados, así como también el líquido de la cavidad torácica y abdominal en fetos abortados.

Diferentes diluciones de las muestras son enfrentadas a cepas de *Leptospira* spp. vivas que provienen de los cultivos del laboratorio.

La prueba se basa en la unión antígeno-anticuerpo que se observa al microscopio de campo oscuro. Se realiza en dos etapas, una primera en la que se utilizan diluciones bajas,

en el caso de bovinos 1/200 y si hay reacción se pasa a una segunda etapa con diferentes diluciones de la muestra para lograr la titulación. Los resultados deben ser interpretados con criterio por tratarse de una prueba indirecta en un agente ampliamente distribuido.

Técnica: (Extraída de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

Los serovares probados en el caso en cuestión fueron: *L. Pomona*, *L. wolffi*, *L. hardjoe*, *L. icterohemorrhagiae* y *L. tarassovi*.

Preparación de los antígenos:

- Fraccionar en tubos 6 mililitros de EMJH.
- Adicionar 120 microlitros de 5 fluorouracilo.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Sembrar 1 mililitro de inóculo.

Procesamiento de muestras:

- Dilución del suero: 25 µl de suero + 2.5 ml de solución fisiológica estéril (dilución 1/100)
- Dilución de líquidos fetales: 250 µl de líquido + 2.5 ml de solución fisiológica estéril (dilución 1/10)
- Colocar 50 µl de solución fisiológica en cada placa + 50 µl de la dilución 1/100 (suero) o 1/10 (líquidos fetales) + 50 µl de antígeno (dilución 1/200).
- Incubar 1 hora en estufa a 37°C.
- Observación en microscopio de campo oscuro.

Neosporosis:

El diagnóstico se realiza de manera indirecta, se buscan anticuerpos contra *Neospora caninum*. Se utiliza suero y líquido fetales que son enfrentados a taquizoítos de *N. caninum* fijados en un portaobjetos. En caso de haber anticuerpos, se ponen en evidencia por acción de un anticuerpo antiespecie marcado con FICT.

Los resultados deben ser interpretados de manera criteriosa ya que *N. caninum* es un agente que se encuentra muy difundido en el mundo entero y la prevalencia serológica en los rodeos de nuestro país es considerable.

Técnica: (Extraída de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

- Llevar a temperatura ambiente los portaobjetos con el antígeno (o en una incubadora a 37°C durante unos minutos)

-Colocar 20 µl de suero diluido por círculo. El suero debe diluirse en solución salina tampón pH 7,2 (Fórmula 1 + albúmina)

-Incubar los portaobjetos en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

-Utilizando una pizeta, lavar suavemente los portaobjetos con solución tamponada para lavado pH 9,0 (Fórmula 2), luego sumergir en la misma solución durante 10 minutos, agitando con una barra magnética.

-Ecurrir los portaobjetos y secar la humedad alrededor de los pocillos. Distribuir 15 a 20 µl de la anti IgG bovina conjugada con fluoresceína en cada círculo. La anti IgG bovina usarla en la dilución 1/100 ó 1/120 diluirla con sol. Fórmula 1 sin albúmina.

-Incubar como en 3.

-Lavar como en 4.

-Ecurrir los portaobjetos y secar bordes y bases de los mismos con toallas de papel. Evitar que se seque la superficie de los círculos. Evitar el lavado con agua.

-Usar solución de montaje pH9 (Fórmula 3) entre el porta y el cubreobjeto.

-Observar al microscopio de fluorescencia con objetivo de aumento de 400x y 1000x.

Campylobacter:

Se realizó por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa, en muestras de líquidos fetales, buscando la presencia de *Campylobacter fetus*. Para la reacción se utiliza un anticuerpo anti-*campylobacter fetus*, marcado con FICT.

Procesamiento de la muestra: (Extraído de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

Limpieza:

1. Los tubos destapados se centrifugan 5 min en punto 4 de la centrifuga (1000 rpm).
2. Trasvasar el sobrenadante a tubos ependorf de manera que coincida el número de ependorf con el número que se le asignó a cada tubo en el cuaderno.

Concentración:

1. Los tubos ependorf se centrifugan en la microcentrifuga a máxima revolución por 15 min. Una vez transcurrido este tiempo se descarta el sobrenadante por inversión rápida del tubo.
2. Se resuspende el sedimento con el líquido del sobrenadante que quedo en el tubo con una micropipeta

Siembra:

1. Identificar cada portaobjeto con un número en el área asignada para identificación.

2. Colocar en cada área circular marcada el portaobjetos una alícuota de la muestra (aprox. 12 µl) sin desbordar el área y sin hacer un menisco muy elevado para evitar el exceso de muestra.

3. Asentar en el cuaderno exclusivo para diagnóstico de trichomoniasis bovina y campylobacteriosis bovina, el número de portaobjetos que corresponde a cada ependorf.

4. Dejar secar los portaobjetos sembrados en estufa a 37°C

5. Fijar 15 min por inmersión en etanol absoluto.

6. Retirar los portaobjetos del etanol y secarlos en estufa a 37 °C

7. Enjuagar con agua destilada 5 seg.

8. Secar en estufa a 37°C

9. Cubrir cada área de la muestra con el conjugado diluido e acuerdo a su titulación.

10. Incubar en cámara húmeda por 1 hora.

11. Lavar con PBS pH 7,2 por inmersión durante 30 minutos, haciendo cambios de PBS cada 10 min. (Resguardar de la luz)

12. Secar los portaobjetos.

13. Colocar una gota glicerina bufferada y cubrir con un cubreobjetos limpio

14. Dejar al abrigo de la luz hasta su observación al microscopio (40x).

Observación

1. Observar los portaobjetos en microscopio de inmunofluorescencia 40x comenzando desde el círculo superior izquierdo que se encuentra al lado del área de identificación del portaobjeto.

Brucelosis:

Para su diagnóstico se utilizaron técnicas indirectas para detección de anticuerpos. En primer lugar se realizó una prueba tamiz de alta sensibilidad como el Buffer Plate Antigen (BPA) y en el caso los de reacciones positivas se recurrió a pruebas complementarias con mayor especificidad, como la polarización fluorescente (FPA).

Técnica de FPA: (Extraída de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

Esta técnica es de muy alta especificidad y sensibilidad.

1-Se coloca 1 mililitro de buffer en tubo de vidrio por cada muestra a probar.

2- Se colocan 10 microlitros de suero problema.

3- Agitar enérgicamente por medio de Vortex.

4-Dejar reposar a temperatura ambiente por 2 minutos.

- 5-Introducir el tubo en el polarímetro para obtener la lectura blanco.
- 6-Retirar el tubo del polarímetro y adicionar 10 microlitros de antígeno brucelico.
- 7-Agitar como paso 3.
- 8-Dejar reposar como paso 4.
- 9-Reintroducir el tubo en el polarímetro respetando el orden del paso 5.
- 10-Anotar la diferencia entre las lecturas del paso 5 y paso 9.

El resultado se arroja en unidades de milipolarización (mp). La Tabla siguiente se muestra la interpretación de lectura de fracción polarizada para brucelosis

Resultado	Lectura
Negativo	menor a 94 mp
Sospechoso	Igual o mayor a 94 mp y menor a 105 mp.
Positivo	Igual o mayor a 105 mp.

Diarrea Viral Bovina:

Se realiza la detección de anticuerpos específicos contra la proteína p80 del virus mediante ELISA de bloqueo.

Se utilizan placas tapizadas con antígeno inactivado del virus, sueros problema y un anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa específico para p80.

Técnica: (Extraída de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

- 1- Preparar dilución de sueros y controles (1/10).
- 2- Aplicar 100 µL por pocillo de muestras y controles positivo y negativo diluidos en la placa de reacción.
- 3- Incubar 1 hora 37°C.
- 4- Lavar 4 veces con 300 µL solución de lavado preparada en paso 1
- 5- Añadir 100 µL de conjugado.
- 6- Incubar 1 hr 37°C.
- 7- Lavar 4 veces con 300 µL sln de lavado preparada en paso 1.
- 8- Agregar 100 µL de solución sustrato (sol 3). Agitar 2 segundos.
- 9- Incubara t° ambiente en oscuridad 10 minutos
- 10- Añadir solución stop (sol 4).
- 11- Leer 450nm

Si la muestra contiene anticuerpos, éstos se unen al antígeno en el fondo del pocillo y de esta manera bloquean la acción del anticuerpo monoclonal. En caso de no poseer anticuerpos (muestra negativa) el anticuerpo monoclonal se une al antígeno y luego de la adhesión de un cromógeno específico de la peroxidasa producirá mayor absorbancia que el suero positivo al que no se une el cromógeno.

Los resultados se informan en porcentajes de inhibición.

% inhibición	Interpretación de los resultados
inferior a 50	Negativo
mayor o igual a 35 y menor a 80	Positivo bajo
mayor o igual a 80	Positivo alto

Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR):

ELISA indirecto. Se utilizan placas con pocillos tapizados con antígeno del virus, se añade suero problema y luego un conjugado que se une a los anticuerpos bovinos. Una vez que se ha formado el complejo antígeno-anticuerpo-anti-anticuerpo, se agrega un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa, lo que produce aparición de color que es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti IBR presentes en la muestra.

Técnica: (Extraída de manual de procedimientos Laboratorios Maffrand)

- 1- Colocar 50 microlitros de control positivo y negativo en los pocillos correspondiente.
- 2- Colocar 50 microlitros de muestra diluída 1/100.
- 3- Incubar durante 1 hora a 37°C.
- 4- Realizar tres lavados con solución de lavado diluída.
- 5- Añadir 50 microlitros de conjugado.
- 6- Incubar ídem paso 3.
- 7- Lavar ídem paso 4.
- 8- Añadir 50 microlitros de sustrato. Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
- 9- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 10- Colocar 50 microlitros de solución Stop.
- 11- Leer la placa con lector de ELISA con filtro de 450nm.

El resultado se expresa en Índice Relativo Por Cien (IRPC).

Valor de IPCR	Resultado
---------------	-----------

Menor o igual a 9	Negativo
Mayor a 9 y menor o igual a 15	Sospechoso
mayor a 15	Positivo

Trichomoniosis:

Ser realizó observación directa de cultivos de líquido de cuajo en caldo de infusión hígado de manera consecutiva durante 7 días.

Técnica: colocar una alícuota de 100 microlitros (1 gota) de caldo de infusión hígado sobre portaobjetos.

-Observar en microscopio óptico en 10x.

Bacteriología:

-Sembrar en medios para enterobacterias agar Mc Conckey, una alícuota de los órganos seleccionados.

-Realizar la misma siembra en medios enriquecidos (agar Sangre)

-Colocar en estufa a 37°C.

-Observar crecimiento a las 24, 48 y 72 horas.

.

ANEXO 2

INFORME DE NECROPSIA

Se recibe el feto: Si..... No.....

Se reciben órganos: Si..... No.....

Detallar los órganos:

-Estado de recepción de la muestra: Bueno:..... Regular:..... Malo:.....

Justificaciones:

-Edad estimada del feto:..... meses..... Peso: Longitud:... cm.....

CARACTERÍSTICAS DE SUBCUTÁNEO:

CAVIDAD ABDOMINAL:

Presencia de líquidos: SI..... NO.....

Características del líquido:

Cantidad: escasa: Abundante: Regular:.....

Aspecto: Turbio: Límpido, transparente:

Color:

-Abomaso (cuajo): presenta contenido: SINO.....

Características del líquido de cuajo:

Cantidad: escasa: Abundante: Regular:.....

Aspecto: Turbio: Límpido, transparente:

Color:

-Intestinos: características:

-Riñón: características

-Hígado: características:

CAVIDAD TORAXICA:

Presencia de líquidos: SI..... NO.....

Características del líquido:

Cantidad: escasa: Abundante: Regular:.....

Aspecto: Turbio: Límpido, transparente:

Color:

-Pulmones: características:

-Corazón: características:

CABEZA:

- Humor acuoso: SI..... NO.....

-Sistema nervioso: características:

Diagnóstico presuntivo:

Conclusiones y comentarios a informar: